



ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО СССР
(ГОСПАТЕНТ СССР)

(51) G 01 N 27/48

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К ПАТЕНТУ



1

(21) 4613363/13

(86) PCT/GB 88/00338 (29.04.88)

(22) 30.12.88

(46) 30.03.93. Бюл. № 12

(31) 8710472

(32) 01.05.87

(33) GB

(71) Кембридж Лайф Саенсиз плс (GB)

(72) Хью Питер Беннетто (GB), Джерард Майкл Делани (IE), Джереми Ричард Мэсон, Кристофер Фрэнк Тёрстон, Джон Леинг Стёрлинг, Дэвид Роберт Де Кейзер, Уильям Генри Муллен (GB)

(56) 1. I. Molroux, P.J. Elving, Mechanistic Aspects of the Electrochemical Oxidation of Dihydrornicotinamide Adenine Dinucleotide (NADH). - Journal of American Chemical Society, 1980, v. 102, № 21, p. 6533-6538.

2. L. Gorton, A. Torstensson, H. Jaegfeldt, G. Johansson. Electrocatalytic Oxidation of Reduced Nicotinamide Coenzyme by Graphite Electrodes Modified with an Adsorbed Phenoxarlnium Salt, Meldola Blue. - Journal of Electroanalytical Chemistry, 1984, v. 161, № 1, p. 103-120.

Изобретение относится к способу получения электрода для использования с целью количественного определения 1,4-дигидроникотинамида аденин динуклеотида (НАДН) в растворе.

НАДН и его окисленная копия НАД являются кофакторами во многих катализируемых ферментами окислительно-восстановительных реакциях. В некоторых из них ферментативный субстрат окисляется в присутствии кофактора НАД в подходящей оксидазе или дегидрогеназе до получения в растворе НАДН, в других - ферментативный

2

(54) СПОСОБ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ЭЛЕКТРОДОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ 1,4-ДИГИДРОНИКОТИНАМИДА АДЕНИН ДИНУКЛЕОТИДА (НАДН) В РАСТВОРЕ

(57) Использование: аналитическая химия, аналитическая биохимия. Сущность изобретения: концентрацию НАДН в анализируемом образце определяют методом электрохимического окисления, причем в качестве электрода используют связанный смолой слой угольных или графитовых частиц, содержащих также частицы платины или палладия. На электроде также могут быть иммобилизованы НАД-зависимые ферменты и НАД. 4 з.п. ф-лы, 1 табл., 10 ил.

субстрат восстанавливается в присутствии кофактора НАДН и получают раствор НАД. Во многих случаях определение концентрации НАДН можно использовать как индикатор концентрации субстрата или как средство для отслеживания ферментативной реакции, в которую вовлечен НАДН (или НАД).

Известно, что концентрацию НАДН в растворе можно определить колориметрически, но колориметрические способы в общем невыгодны. Значительно более выгодными являются электрохимические

способы, но до сих пор попытки определить НАДН электрохимическим способом не достигали успеха. Известно, например, что концентрацию НАДН можно определить амперометрическим способом, при котором НАДН окисляют на электроде при фиксированном контролируемом потенциале, причем ток, проходящий при подходящих условиях, пропорционален концентрации НАДН. К сожалению, электрохимическое окисление НАДН требует высокого сверхпотенциала и НАДН обычно не окисляется непосредственно на поверхности электрода, например, во многих случаях поверхность электрода быстро выходит из строя из-за образования на ней пленки, которая оказывает влияние на величину и скорость электрохимической реакции (1).

Предпринималось множество попыток преодолеть эту проблему. Например, было предложено использовать модифицированные электроды, покрытые слоем проводящих органических солей. Кроме того, предлагалось использовать адсорбированный редокс медиатор, такой как мелдоло синий, для того, чтобы более эффективно привязать реакцию окисления к электроду и/или снизить окислительный потенциал (2). В других случаях редокс медиаторы использовали в свободном растворе. Например, метокси феназин метосульфат использовали с модифицированным пиролитическим графитовым электродом. Другие эксперименты проводили с платиновым, графитовым и стеклянным угольным электродом, однако способ быстрого и воспроизводимого определения НАДН не был разработан.

Цель изобретения – повышение операционной стабильности электрода.

В соответствии с настоящим изобретением обнаружили, что НАДН и НАДРН могут быть окислены с хорошим амперометрическим ответом и при пониженном перенапряжении при использовании электрода из активированного угля такого типа, который используется в технологии топливного элемента и который включает гетерогенный связанный смолой слой благородного металла, содержащий предпочтительно палладированные или платинизированные (этот термин включает материалы, содержащие оксиды платины и/или палладия или образованные ими, а также материалы, включающие металлические платину или палладий или обработанные ими) частицы графита или угля, связанные натуральной или синтетической смолой, предпочтительно синтетическим гидрофобным связующим, таким как фтороуглеродная смола,

наиболее предпочтителен политетрафторэтилен.

Следовательно, по своим отличительным свойствам в соответствии с настоящим изобретением предлагается способ получения электрода для количественного электрохимического определения НАДН и НАДРН, включающий модификацию электрода из углеродного материала при помощи адсорбции материалов, которые уменьшают перенапряжение электроокислительной реакции. Используют связанный смолой слой частиц древесного угля или графитных частиц размером от 5 до 30 нм в качестве углеродного материала, а частицы платины или палладия, или оксидов платины или палладия коллоидного размера от 1,5 до 2,5 нм используют в качестве материалов, которые снижают перенапряжение электроокислительной реакции.

Связанный смолой слой платинизированных или палладизированных частиц угля или графита может быть самостоятельным, но часто у него имеется подложка, предпочтительно электропроводная и предпочтительно слой электропроводной угольной бумаги, с которой связаны платинизированные или палладизированные частицы угля или графита, как поверхностный слой, или пропитанная угольная волокнистая ткань. Несмотря на то, что предпочтительны платинизированные или палладизированные материалы, можно использовать и электроды из активированного угля, содержащие другие благородные металлы, например золотосодержащие.

Термины "платинизированный" и "палладизированный" включают также и оксиды.

Термин "активированный" уголь, "активированный" графит и т.п. относятся к высокопористому, с большой площадью поверхности угольному или графитовому материалу с площадью поверхности $50 \text{ м}^2/\text{г}$ или более, чаще больше $200 \text{ м}^2/\text{г}$, например $200\text{--}600 \text{ м}^2/\text{г}$ или больше. Материалы с такой большой площадью поверхности получали, например, путем тепловой обработки угольных или графитных порошков в потоке CO_2 .

Кроме уже перечисленных преимуществ, а именно стабильности, воспроизводимости и короткого времени ответа, еще одним преимуществом настоящих материалов является то, что их можно использовать для отслеживания концентраций НАДН при сравнительно низких потенциалах, например $0\text{--}600 \text{ мВ}$, или даже при отрицательных потенциалах со стандартными $\text{Ag}/\text{Ag Cl}$ электродами, против 750 мВ , упоминавших-

ся выше для отслеживания концентрации НАДН с использованием стеклянных, угольных или графитовых электродов. Электроды настоящего изобретения характеризуются относительно низким обратным током и поэтому повышенной чувствительностью. Эти электроды также характеризуются слабой реакцией на потенциально входящие частицы, такие как мочева кислота, часто присутствующие в биологических или клинических пробах.

Предпочтительными подложками для электродов по изобретению являются материалы, которые используются как электрокаталитические газовые диффузионные электроды в топливных элементах. В общем случае коллоидную платину с размером частиц 15-25 Å (1,5-2,5 нм) адсорбируют на поверхность порошкового угля (размер частиц 50-300 Å, 5-30 нм), например, путем образования платинового раствора на месте в присутствии порошкового угля, который действует как инициатор образования центров кристаллизации в растворе. Платинизированные частицы угля затем наплавляют на электропроводную подложку, например электропроводную угольную бумагу, используя синтетическую связующую смолу, предпочтительно углеводородную смолу, и в частности политетрафторэтилен. В другом случае может быть использован оксид платины или палладия с таким же размером частиц вместо коллоидной платины, и его адсорбируют на частицы угля или графита таким же образом. По другому способу США платинизированные частицы угля внедряют в предварительно приготовленную пористую угольную ткань и связывают с ней фтористоуглеродной смолой, предпочтительно политетрафторэтиленом. Настоящее изобретение не ограничивается использованием материалов Prototech, возможно использование других аналогичных материалов для подложек, включающих пористый связанный смолой слой платинизированных, палладиизированных или содержащих другой благородный металл частиц графита или активированного угля.

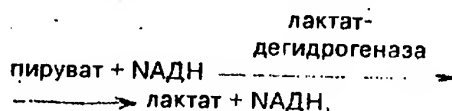
Несмотря на то что предпочтительными связующими смолами, используемыми для связывания платинизированных или палладиизированных частиц графита или угля, являются гидрофобные фтористо-углеродные смолы, в частности политетрафторэтилен, можно использовать другие подходящие натуральные или синтетические смолы, например полиэтилметакрилат, поливинилацетат, поливинилхлорид, поликарбонаты, поли(4-метилпентен-1)полиизопрен, полихлороп-

рен, поли(1,3-бутадиен), кремнийорганический каучук или желатин.

Соотношение связующего и содержащих благородный металл частиц угля или графита по весу составляет 10-75% связующего и 90-25% активированного угля или графита, предпочтительно 20-50% связующего и, соответственно, 80-50% активированного угля или графита. Наполнение благородным металлом, например платиной или палладием, или их соответствующими оксидами, или золотом частиц активированного угля или графита составляет 1-10% веса активированного угля или графита и связующего, предпочтительно 2-8%, еще предпочтительнее 4-6%.

Вместо наплавления смеси смолы с платинизированным или палладиизированным порошком активированного угля непосредственно на поверхность подходящей подложки, например непосредственно на поверхность электропроводной угольной бумаги, смесь связующего и платинизированного или палладиизированного угольного порошка может быть суспендирована в подходящей инертной среде и нанесена на поверхность подложки с помощью трафаретной печати, в результате чего получают тонкую пленку связанных смолой платинизированных или палладиизированных угольных частиц на поверхности подложки.

Кроме прямого количественного определения содержания НАДН в растворе, электроды и способ по настоящему изобретению можно использовать для количественного определения количества НАДН, вырабатываемого или расходуемого на месте, например при ферментативной реакции между ферментом и его кофактором. Такие реакции включают, например, превращение пирувата в лактат через лактат дегидрогеназу



причем контролировать эту реакцию можно по уменьшению концентрации НАДН, и окисление глюкозы до глюконолактона по реакции



→ D-глюконолактон + НАДН, которую можно контролировать по увеличению концентрации НАДН по мере прохождения реакции. В этом случае фермент, такой как лактат дегидрогеназа или глюкоза дегидрогеназа, может быть включен в слой

или иммобилизован на слое платинизированного или палладиизированного угольного электрода по настоящему изобретению с помощью любой известной методики включения фермента.

Еще в одном варианте осуществления настоящее изобретение содержит электрод и способ, в которых сам ферментный электрод включает не только иммобилизованный фермент, но также подходящий кофактор этого фермента, либо НАДН, либо НАДН как в данном случае, таким образом, ферментный электрод обладает способностью электрически реагировать на активность фермента, что определяется по изменению концентрации НАДН при контакте с образцом, например клинической или биологической пробой, содержащей соответствующий субстрат для фермента, независимо от того, содержит ли образец необходимый кофактор, так как его поставляет сам электрод. НАД или НАДН кофактор может быть включен в электрод любым подходящим способом, таким как пропитка подходящим раствором НАД или НАДН с последующей сушкой.

Как известно в технике, поверхность электродного материала может быть или не быть защищена пористой мембраной, такой как поликарбонатная пленка с размером пор 0,03 мкм. Можно использовать и другие подходящие материалы для мембраны.

На фиг. 1 представлен разрез модифицированного электрохимического элемента Rank Brothers, который использован для определения ответа НАДН активированного угольного электрода в соответствии с настоящим изобретением.

На фиг. 2 показан ответ электрода на последовательное добавление НАДН в элемент при использовании платинизированного угольного бумажного электрода (РСР) по настоящему изобретению; на фиг. 3 – ответ электрода РСР на НАДН при различных равновесных потенциалах на Ag/Ag Cl электроде; на фиг. 4 – ответ электрода на пировиноградную кислоту в присутствии лактата дегидрогеназы (LDH); на фиг. 5 – ответ электрода на ацетальдегид в присутствии алкогольдегидрогеназы (АДН); на фиг. 6 – ответ платинизированных угольных бумажных электродов на концентрацию НАДН по настоящему изобретению; на фиг. 7 – ответ электрода на пировиноградную кислоту; на фиг. 8 – ответ электрода на НАДН, полученную на месте путем ферментативного окисления глюкозы дегидрогеназы; на фиг. 9 показана аналогичная кривая для электрода, содержащего оксид платины; на фиг. 10 – кривая для палладиизиро-

ванного активированного угольного электрода.

В следующих примерах испытывали различные платинизированные или палладиизированные угольные бумажные (РСР) электроды на их ответ на НАДН в модифицированных системах Рэнк кислородных электродов, как показано на фиг. 1. Модифицированная Рэнк система содержит элемент из двух частей: основного электрода (1) и кольцевого кожуха (2), включающий водяную камеру (3), через которую может циркулировать вода для регулирования температуры элемента, причем обе эти части соединены с помощью навинчивания хомута (4). По центру основного электрода (1) расположена платиновая контактная кнопка (5), на которую помещен испытываемый диск (6) из бумажного электродного материала и который удерживается на платиновом контакте с помощью резиновых О-образных уплотнителей (7) и (8) во время соединения двух частей элемента.

В верхней части элемента, который содержит испытываемый содержащий НАДН раствор, установлен упор (9), фиксируемый регулируемым хомутом (10). В упор вмонтирован обратный платиновый электрод (11) и Ag/Ag Cl эталонный электрод (12). Испытания проводят при потенциале рабочего электрода относительно эталонного Ag/Ag Cl электрода в диапазоне 100–600 мВ. Другие испытания проводят в двухэлектродном элементе. В двухэлектродном элементе электродный материал удерживается на платиновой контактной кнопке на основании элемента с помощью поликарбонатной (размер пор 0,03 мкм) мембраны, на которую подают образец, содержащий НАДН. Кольцевой эталонный Ag/Ag Cl электрод расположен вокруг платинового контакта в основании элемента и отделен от него изолирующей втулкой. На элемент подают разное напряжение относительно эталонного электрода и записывают выходной ток при разных напряжениях.

Изобретение иллюстрируется примерами, в которых электродный материал представляет собой платинизированную угольную бумагу (РСР), разработанную как газовые диффузионные электроды. РСР электродный материал получают по методике, по которой сначала платинизируют частицы угольного порошка (Vulcan XC-72, номинальный размер частиц 30 нм) с помощью окислительной деструкции комплекса сульфата платины в присутствии угольного порошка при использовании H_2O_2 , в результате чего коллоидная платина с размером частиц 1,5–2,5 нм осаждается на

поверхность частиц угольного порошка. Затем платинизированный угольный порошок расплавляют и наплавляют на поверхность графитизированной электропроводной угольной бумаги, используя 50% от веса платинизированной угольной бумаги политетрафторэтилена в качестве связующего. Полученный платинизированный угольный бумажный электродный материал имеет толщину 0,1–0,5 мм, а платинизированный слой 0,24 мг/см². Для испытаний (примеры 1–3) угольный бумажный электродный материал нарезают на диски диаметром 5 мм и укрепляют на платинизированном рабочем электроде, показанном на фиг. 1. В каждом случае площадь электрода из угольной бумаги, соприкасающаяся с образцом, составляет 0,16 см². Получены следующие результаты.

Пример 1. Электрохимическое окисление НАДН на платинизированной угольной бумаге (РСР).

Используя стандартную потенциостатическую методику, образцы 20 мМ НАДН раствора в трис-НСI буфере с pH 9 добавили в элемент, содержащий 2 мл смеси 0,1 М фосфата с pH 7 и 1 М KCl буферного раствора. Платинизированный угольный бумажный электрод (РСР) поддерживают под разными потенциалами по отношению к эталонному Ag/Ag Cl электроду. Обратный электрод – платиновый. Получены участки постоянного тока (фиг. 2), пропорциональные концентрации НАДН (таблица и фиг. 3).

Пример 2. Ответ НАДН – электродной системы на пировиноградную кислоту в присутствии лактат дегидрогеназы (LDH)

Используют аналогичный элемент, содержащий 12,5 мМ НАДН и 10 мМ пировиноградной кислоты в 2 мл растворе фосфата в KCl буфере с pH 7 при температуре 25°C. Рабочий, обратный и эталонный электроды такие же, как в примере 1. Рабочий электрод находится под напряжением 400 мВ и дает постоянный сигнал 170 мкА выше обратного тока. После добавления 120 единиц LDH (сердце быка тип XV) ток уменьшается с первоначальной скоростью 92 мкА/мин (фиг. 4). Это показывает, что ферментативное превращение пировата в лактам эффективно отслеживается с помощью НАДН, электрохимически соединенного с электродом.

Пример 3. Ответ НАДН-электродной системы на ацетальдегид в присутствии алкоголя дегидрогеназы (АДН) на РСР электроде

В элемент помещают 3 мМ НАДН и 35 мМ ацетальдегида в 2 мл буферного раствора трис/НСI с pH 9 при температуре 25°C. Ра-

бочий, обратный и эталонный электроды – как в примере 1. Рабочий электрод имеет потенциал 400 мВ и дает постоянный сигнал 40 мкА выше обратного. После добавления 2 единиц АДН (печень лошади) ток падает с начальной скоростью 130 мкА/мин (фиг. 5) показывая, что ферментативное превращение ацетальдегида в этанол эффективно отслеживается через посредство НАДН, электрохимически связанного с электродом.

В следующих примерах использованы либо двухэлектродные, либо трехэлектродные элементы. Трехэлектродные элементы проиллюстрированы на фиг. 1.

Пример 4 (фиг. 6). Данные получены при использовании двухэлектродной ячейки, поляризованной при 200 мВ. Используют буферный раствор 16 ммоль/л NaH₂PO₄, 53 ммоль/л Na₂HPO₄, 52 ммоль/л NaCl, 1,5 ммоль/л этилендиамин тетрауксусной кислоты с pH 7,4. После достижения в этом буфере стабильного обратного тока буфер удаляют с мембраны и заменяют образцом НАДН в том же буфере. Фиксируют пиковый ток. На фиг. 6 показаны ответы платинизированного угольного бумажного электрода фирмы, который включает связанные смолой платинизированные частицы угля, нанесенные на электропроводную угольную бумажную подложку, причем связанный смолой платинизированный угольный слой содержит по массе 50% политетрафторэтилена, 45% угля тонкого помола (Vulcan XC72) и 5% коллоидной платины, предварительно адсорбированной на угольный порошок. Для минимизации обратного тока адсорбируют 5 мг/мл белкового раствора (глюкозооксидаза) на электрод в течение ночи перед измерением НАДН. Следует указать на то, что глюкозооксидаза является подходящим белком.

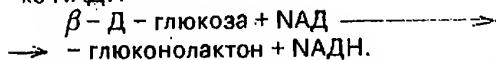
Пример 5 (фиг. 7). Этот пример иллюстрирует применимость настоящего изобретения для измерения использующих НАДН ферментов. Используют трехэлектродную ячейку, снабженную магнитной мешалкой. Рабочий электрод представляет собой платинизированную угольную бумагу, как в примере 4, но L-лактатдегидрогеназу (ЕС 1.1.1.27 из коровьего сердца) внедряют в электрод через карбодиимидное соединение.

Первоначально ячейка содержит 12,5 ммоль/л НАДН в буферном растворе 0,1 моль/л фосфата и 1 моль/л KCl с pH 7. Поляризующий потенциал составляет 350 мВ. Устройство можно использовать для отслеживания расхода НАДН, когда в

элемент добавляют аликвоты пировиноградной кислоты, как показано на рисунке.

Пример 6 (фиг. 8). Пример 5 повторяют, за исключением того, что иммобилизованную лактатдегидрогеназу заменяют глюкозодегидрогеназой (ЕС 1.1.1.47 из *Bacillus* sp., поставляемую Sigma, 100–300 Ед/мг протеина), иммобилизованной на электрод таким же способом. В то время как лактатдегидрогеназу используют для определения количества пировиноградной кислоты путем отслеживания расхода НАДН

пируват + НАДН \longrightarrow лактат + НАД
глюкозодегидрогеназу используют для определения количества глюкозы по выработке НАДН



Элемент содержит 0,1 моль/л фосфата, 0,1 моль/л KCl, 2,4 ммоль/л НАД при pH 7.

Пример 7 (фиг. 9). По методике примера 4 выход с содержащего оксид платины угольного электрода измеряют при 200 мВ (по отношению к эталонному Ag/Ag Cl электроду) в двухэлектродном элементе при различных концентрациях НАДН. Получен практически линейный ответ, эквивалентный тому, что получают при платинизированных угольных бумажных электродах. В этом случае электродный материал включает слой связанных смол (политетрафторэтилен) угольных частиц, причем 5% по весу (от общего веса связанных смолы частиц) оксида платины предварительно адсорбировано на частицы угольного порошка; связующее 50% по весу, уголь 45% по весу, и связанных с поверхностью электропроводной Toray (торговая марка) угольной бумаги.

Пример 8 (фиг. 10). По методике примера 4 выход тока с палладиизированного угольного бумажного электрода измеряют при 200 мВ (по отношению Ag/Ag Cl), используя двухэлектродный элемент при различных концентрациях НАДН. В этом случае также имеют линейный ответ (фиг. 10). Электродный материал, как описано в примере 7, имеет связанные смолой частицы угля, которые включают 5% по весу предварительно адсорбированной платины тонкого помола.

В описанных примерах продемонстрировано использование электродных материалов для проведения быстрого и воспроизводимого окисления НАДН. Эти ответы значительно отличаются от результатов, которые получают с другими электродными материалами, как показано в сравнительных примерах при использовании платины, стеклоуглерода или графитового

электродного материала, которые (за редким исключением) обычно вязкие, относительно нечувствительные и значительно с худшей воспроизводимостью. Представляется, что эффективность использованных платинизированных или палладиизированных угольных электродов является результатом их гетерогенной структуры и их совместимости с биологическими молекулами, такими как НАДН и ферменты. Окисление НАДН также эффективно проходит в присутствии ферментов и субстратов и может быть использовано в качестве базиса для быстрого связанного с НАДН ферментативного исследования. Эффективность исследований пирувата (с использованием LDH) и ацетальдегида (с использованием АДН) видна из примеров, но большое число аналогичных исследований можно провести, используя другие ферменты и субстраты.

Токовый ответ платинизированной угольной бумаги на концентрацию НАДН при различных равновесных потенциалах.

Формула изобретения

1. Способ приготовления электродов для количественного электрохимического определения 1,4-дигидроникотинамида адеин динуклеотида (НАДН) в растворе, включающий модификацию электрода из углеродного материала путем адсорбции веществ, снижающих перенапряжение в реакции электроокисления, отличающийся тем, что, с целью повышения операционной стабильности электрода, в качестве углеродного материала используют связанный смолой слой угольных или графитовых частиц размером 5–30 нм, а в качестве веществ, снижающих перенапряжение реакции электроокисления, используют частицы платины или палладия коллоидного размера 1,5–2,5 нм.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что в качестве смолы используют политетрафторэтилен.

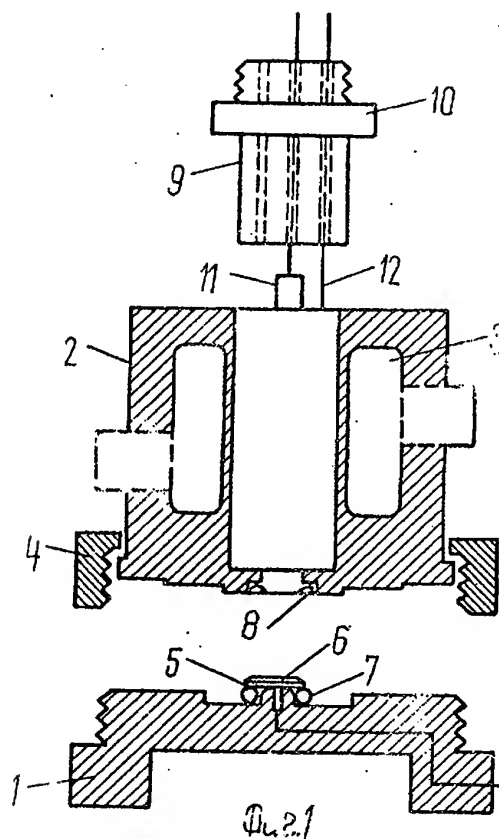
3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что связанный смолой слой угольных или графитовых частиц с адсорбированными частицами металла или окиси металла наносят на поверхность электропроводящего подложечного слоя, представляющего собой электропроводную углеродную бумагу.

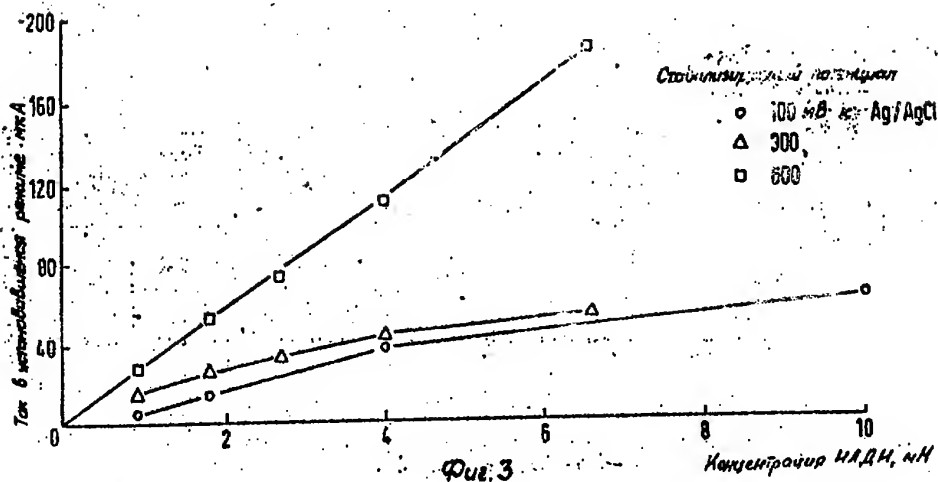
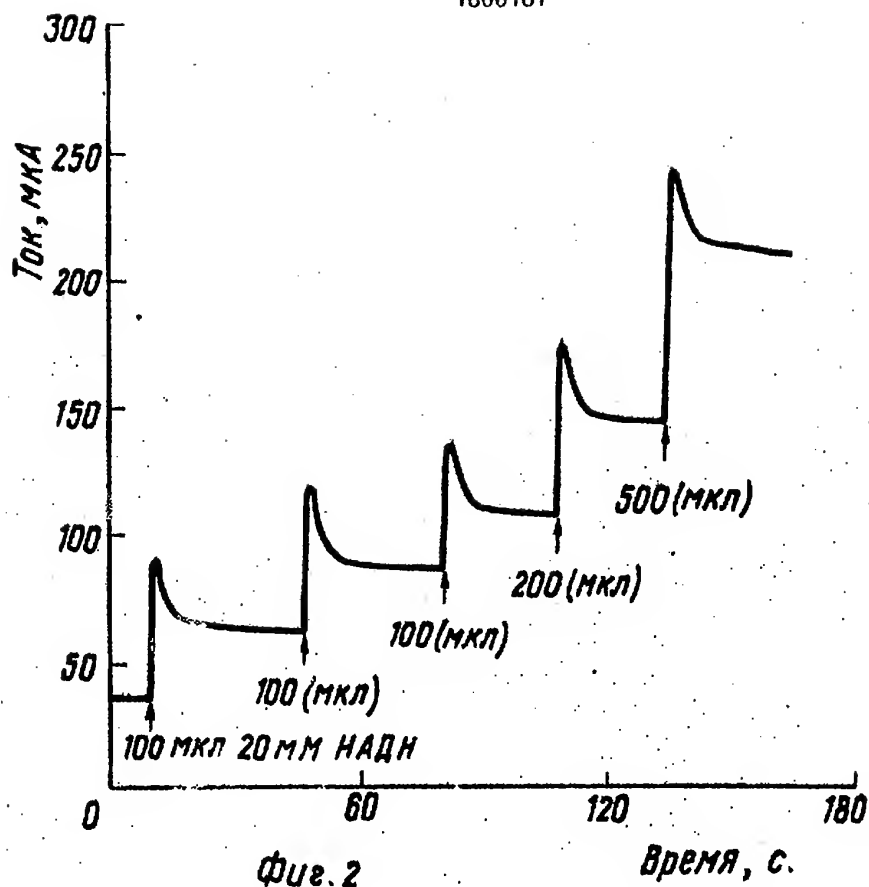
4. Способ по пп. 1 и 3, отличающийся тем, что на поверхности электрода иммобилизуют NAD-зависимый фермент.

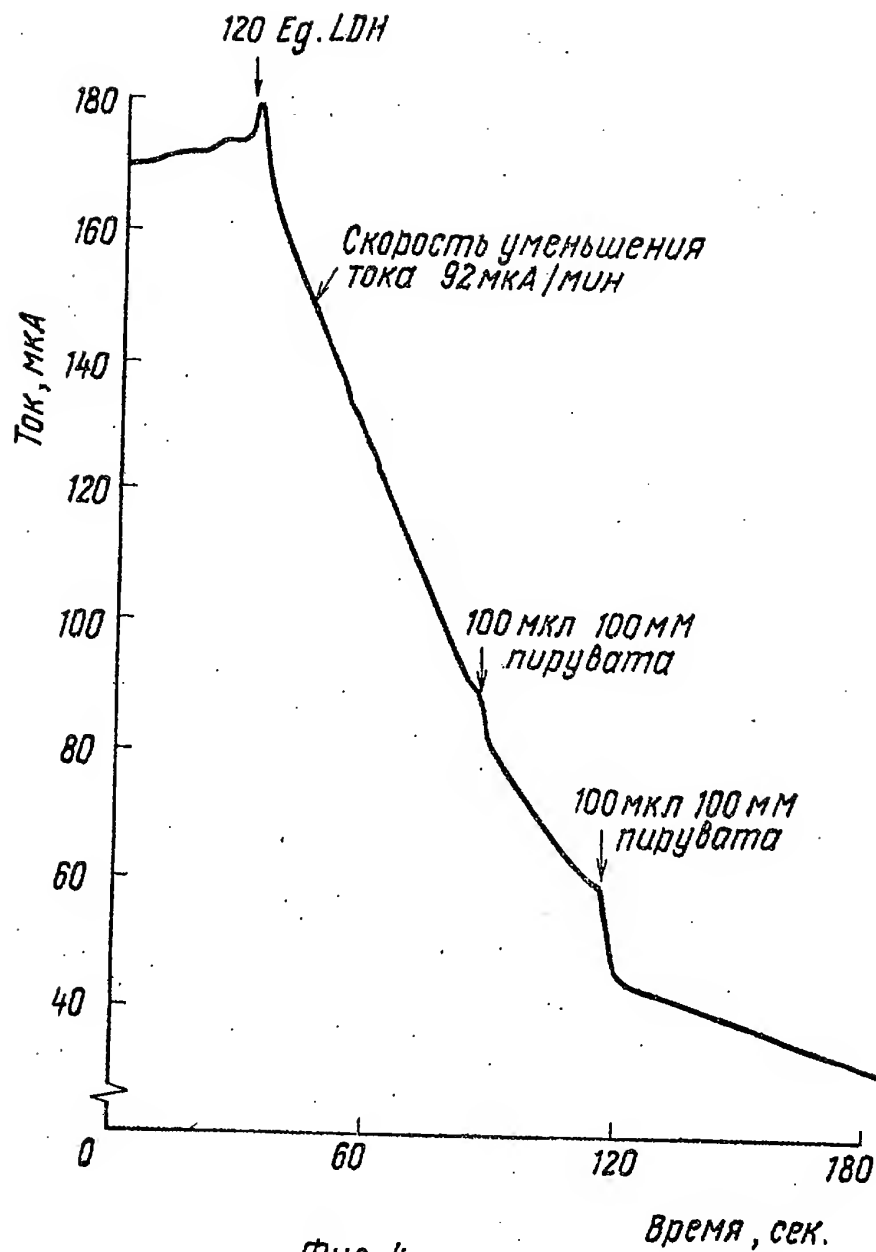
5. Способ по п. 4, отличающийся тем, что на поверхности электрода дополнительно иммобилизуют кофактор NAD или НАДН.

Токовый ответ платинизированной угольной бумаги на концентрацию НАДН при различных равновесных потенциалах

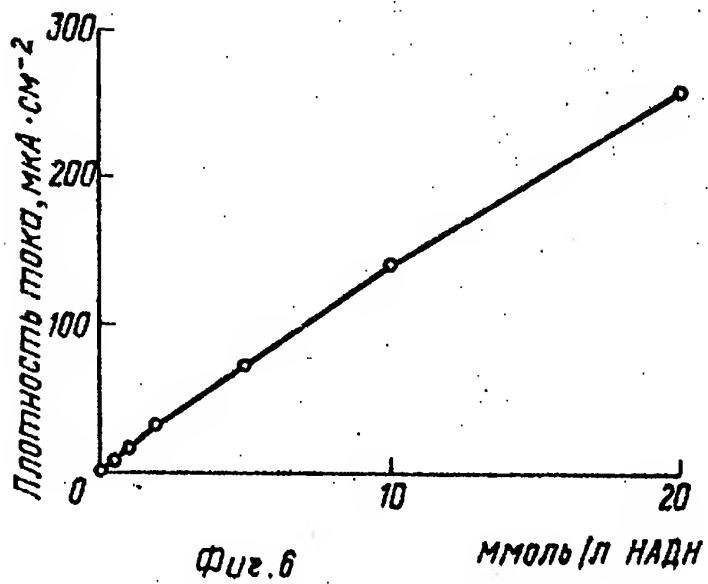
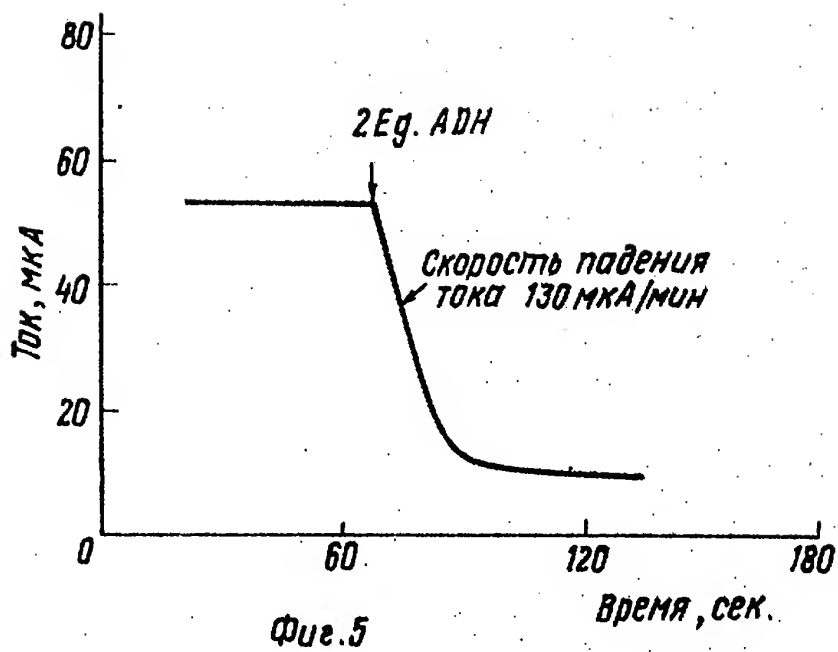
Концентрация НАДН, мм	100 мВ	Выход тока 300 мВ	мкА при 600 мВ
0,95	7	15	28
1,8	13	25	53
2,7	—	32	73
4,0	38	42	113
6,6	—	52	183
10,0	60	—	—

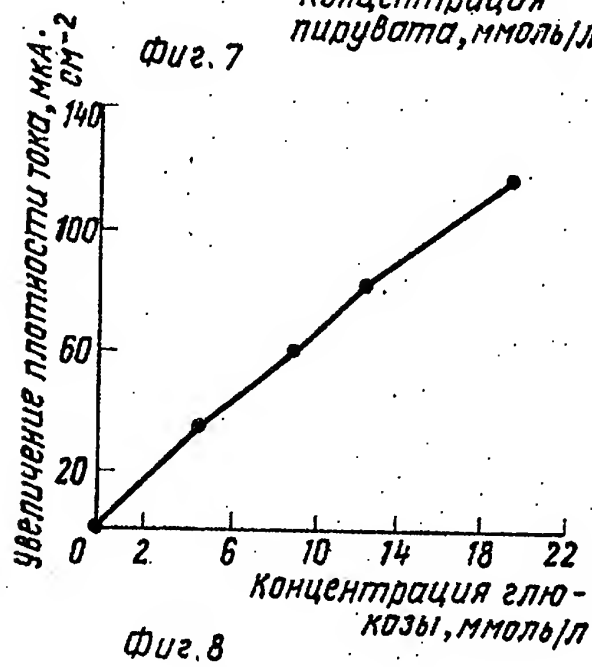
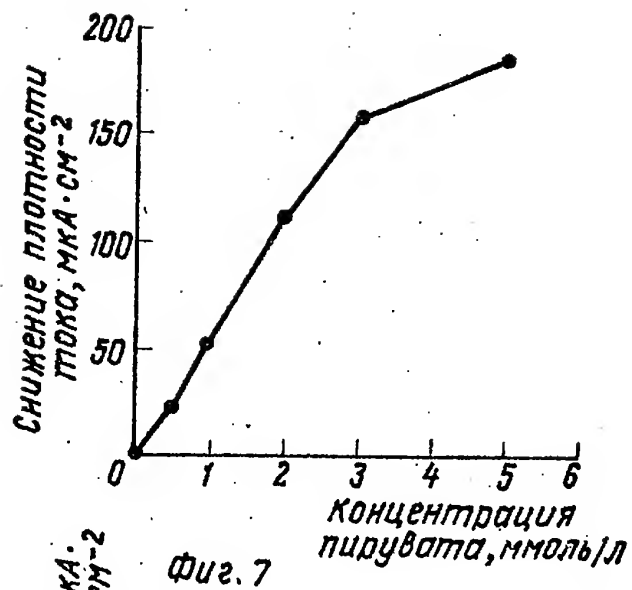


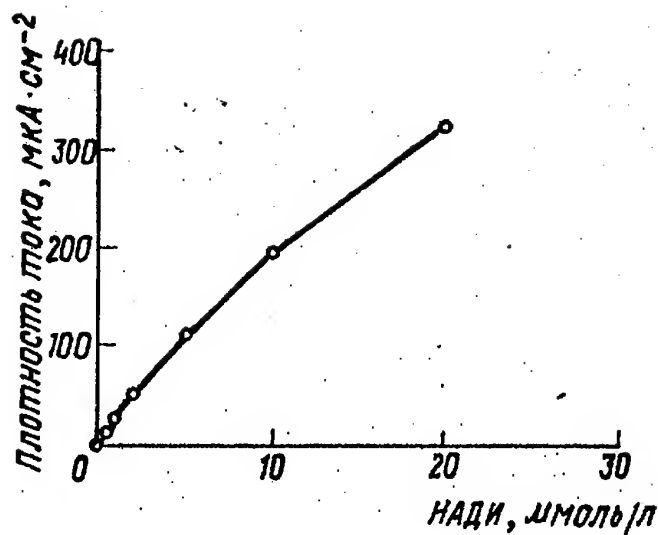




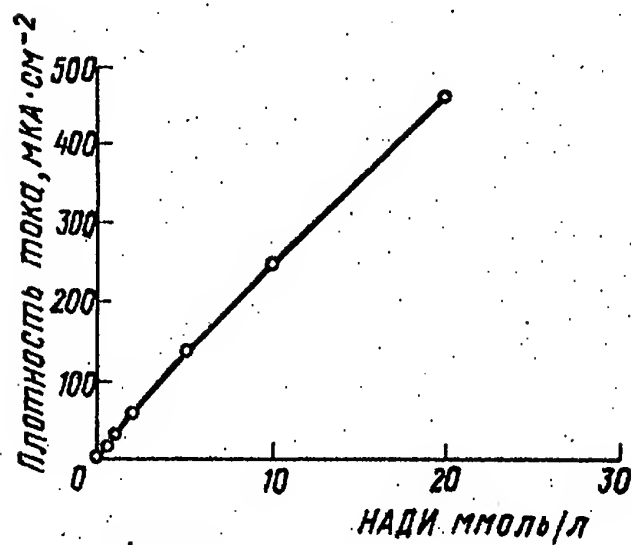
Фиг. 4







Фиг. 9



Фиг. 10

Редактор	Составитель А. Семенов Техред М.Моргентал	Корректор С. Гуси
Заказ 965	Тираж	Подписное
ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР 113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., 4/5		
Производственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул.Гагарина, 101		

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<p>(51) International Patent Classification ⁴ : C12M 1/40, G01N 33/48</p>	<p>A1</p>	<p>(11) International Publication Number: WO 88/ 08447 (43) International Publication Date: 3 November 1988 (03.11.88)</p>
<p>(21) International Application Number: PCT/GB88/00338 (22) International Filing Date: 29 April 1988 (29.04.88) (31) Priority Application Number: 8710472 (32) Priority Date: 1 May 1987 (01.05.87) (33) Priority Country: GB (71) Applicant (for all designated States except US): CAMBRIDGE LIFE SCIENCES PLC [GB/GB]; Cambridge Science Park, Milton Road, Cambridge, Cambridgeshire CB4 4GN (GB). (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only) : BENNETTO, Hugh, Peter [GB/GB]; 64 Woodheyas Road, London NW10 (GB). DELANEY, Gerard, Michael [IE/GB]; 96 St. Stephen's Avenue, London W12 (GB). MASON, Jeremy, Richard [GB/GB]; 45 Friar's Place Lane, London W3 (GB). THURSTON, Christopher, Frank [GB/GB]; 26 Ranalagh Road, London W5 (GB). STIRLING, John, Laing [GB/GB]; 78 Twyford Avenue, London W3 (GB).</p>	<p>DeKEYZER, David, Robert [GB/GB]; 4 Poundfield Court, Old Woking, Surrey GU22 8LA (GB). MULLEN, William, Henry [GB/GB]; 61 Martin Close, Soham, Ely, Cambridgeshire CB7 5EJ (GB). (74) Agent: LAMBERT, Hugh, Richmond; D. Young & Co., 10 Staple Inn, London WC1V 7RD (GB). (81) Designated States: AU, DK, FI, HU, JP, KR, NO, SU, US. Published With international search report.</p>	
<p>(54) Title: AMPEROMETRIC METHOD FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF 1,4-DIHYDRONICOTINAMIDE ADENINE DINUCLEOTIDE (NADH) IN SOLUTION</p>		
<p>(57) Abstract</p> <p>A method is disclosed for the quantitative determination of 1,4-dihydronicotinamide adenine dinucleotide (NADH) in solution. The method comprises contacting the NADH-containing solution with an activated carbon electrode, maintaining the carbon electrode at a controlled, fixed potential effective to cause oxidation of NADH at the electrode surface, and measuring the current output from the carbon electrode, wherein there is used a noble metal containing preferably platinised or palladised activated carbon electrode comprising a porous, heterogeneous, resin-bonded layer of activated carbon or graphite particles comprising the finely divided noble metal preadsorbed thereon, and bonded together with a natural or synthetic resin binder, preferably a hydrophobic resin such as polytetrafluoroethylene.</p>		

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AT	Austria	FR	France	ML	Mali
AU	Australia	GA	Gabon	MR	Mauritania
BB	Barbados	GB	United Kingdom	MW	Malawi
BE	Belgium	HU	Hungary	NL	Netherlands
BG	Bulgaria	IT	Italy	NO	Norway
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Romania
BR	Brazil	KP	Democratic People's Republic of Korea	SD	Sudan
CF	Central African Republic	KR	Republic of Korea	SE	Sweden
CG	Congo	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CH	Switzerland	LK	Sri Lanka	SU	Soviet Union
CM	Cameroon	LU	Luxembourg	TD	Chad
DE	Germany, Federal Republic of	MC	Monaco	TG	Togo
DK	Denmark	MG	Madagascar	US	United States of America
FI	Finland				

AMPEROMETRIC METHOD FOR THE QUANTITATIVE
DETERMINATION OF 1,4-DIHYDRONICOTINAMIDE ADENINE
DINUCLEOTIDE (NADH) IN SOLUTION

5 This invention relates to a method for the quantitative determination of 1,4-dihydronicotinamide adenine dinucleotide (NADH) in solution.

 NADH and its oxidised counterpart NAD are cofactors in numerous enzyme catalysed redox reactions. In some, an enzyme substrate is oxidised in the presence of cofactor NAD and a suitable oxidase or dehydrogenase to
10 yield NADH in solution; in others an enzyme substrate is reduced in the presence of cofactor NADH to yield NAD in solution. In many cases, determination of the NADH concentration can be used as an indicator of substrate concentration, or as a means of following the course of an enzyme reaction involving NADH (or NAD).

15 It is known that NADH concentration in solution can be measured colorimetrically, but colorimetric methods on the whole are disadvantageous. Much more advantageous are electrochemical methods, but attempts to determine NADH electrochemically have so far not met with any very great degree of success. It is known, for example, that NADH concentration
20 can be determined by an amperometric assay in which NADH is oxidised at an electrode at a fixed, controlled, potential, the current passing under suitable conditions being proportional to NADH concentration. Unfortunately the electrochemical oxidation of NADH requires a high overpotential, and the NADH is generally not oxidised cleanly at the electrode surface; for
25 example, in many cases the surface of the electrode is quickly fouled by formation of a surface film which affects the size and speed of the electrochemical response: I. Moiroux and P.J. Elving, J. Amer. Chem. Soc. (1980) 102, 6533-6538, and D.G. Johnson, M.D. Ryan and G.S. Wilson, Analyt. Chem. (1986) 58, 42R.

30 There have been many attempts to avoid these problems. For example, it has been proposed to use modified electrodes coated with a layer of conducting organic salts: J.J. Kulys, Biosensors (1986) 2, 3-13. Alternatively it has been proposed to use an adsorbed redox mediator such as Meldola's blue to couple the oxidation reaction more effectively to the
35 electrode and/or to lower the oxidation potential: L. Gorton et al., J. Electroanalyt. Chem. (1984), 161, 103-20. In another proposal redox

mediators have been used in free solution. For example, methoxy phenazine methosulphate has been used with a modified pyrolytic graphite electrode: Y. Kimura and K. Nihi, *Analytical Sciences* (1985), 1, 271-4. Other experiments have been carried out with platinum, graphite and glassy carbon electrodes, but as yet no electrochemical method for the determination of NADH has been developed which is both rapid and reproducible.

In accordance with the present invention it has been discovered that NADH can be oxidised cleanly, with good amperometric response, both in buffer solutions containing NADH alone, and in solutions containing enzyme, enzyme substrate and NADH, using an activated carbon electrode of a type used in fuel cell technology and comprising a heterogeneous resin-bonded layer of noble metal containing, preferably platinised or palladised (which terms as used herein include materials containing or treated with platinum and/or palladium oxide, as well as materials containing or treated with platinum or palladium metal) carbon or graphite particles bonded with a natural or synthetic resin binder, preferably a synthetic, hydrophobic binder, such as a fluorocarbon resin, most preferably polytetrafluoroethylene. Preferably a platinised or palladised activated carbon electrode is used in which the carbon or graphite particles are platinised or palladised by adsorbing or depositing colloidal platinum or palladium metal, or platinum or palladium oxide, onto the surface of the powder particles before bonding, the resultant electrode comprising a heterogeneous porous activated carbon powder layer with colloidal platinum or palladium, or the corresponding oxides, distributed substantially uniformly throughout the layer. The resin-bonded layer of platinised or palladised activated carbon or graphite particles may be self-supporting, but will usually be supported by a support member, preferably an electrically conductive support member, and preferably a layer of electrically conductive carbon paper to which the platinised or palladised carbon or graphite particles are bonded as a surface layer, or impregnated into a carbon fibre web. Whilst the platinised and palladised materials are preferred, other noble metal containing activated carbon electrodes, e.g. gold containing electrodes, may be used.

Herein, the terms "platinised" and "palladised" include the oxides unless the context requires otherwise.

Also herein, the terms "activated" carbon, "activated" graphite, etc. refer to highly porous, high surface area carbon and graphite materials

having surface areas of 50 m²/g or greater, and more usually in excess of 200 m²/g, e.g. from 200 to 600 m²/g or higher. Such high surface area materials are obtained, for example, by heat treatment of carbon or graphite powders in steam or CO₂ to give a high surface area product generally referred to in the art as "activated carbon".

Quite apart from the stability, reproducibility, and rapid response times already mentioned, a further particular advantage of the present materials is that they can be used to monitor NADH concentrations at relatively low potentials, e.g. in the range 0 to 600 mV or even at negative potentials with reference to the standard Ag/AgCl reference electrode, as against the 750 mV and upwards required to monitor NADH concentrations using glassy carbon or graphite electrodes. The present electrodes are thus characterised by relatively low background current, and hence improved sensitivity. The electrodes are also characterised by their low response to potentially interfering species, such as uric acid, frequently present in biological or clinical samples.

The preferred electrode substrates used in accordance with this invention are, in fact, commercially available materials sold by the Prototech Company of Newton Highlands, Massachusetts, and used heretofore as electrocatalytic gas diffusion electrodes in fuel cells. The preparation of such materials is described in detail in US-A-4,044,193, US-A-4,166,143, US-A-4,293,396 and US-A-4,478,696, to which reference should be made for full details. In broad detail, however, colloidal platinum with a particle size in the range 15 to 25 Angstroms (1.5 to 2.5 nm) is adsorbed onto the surface of powdered carbon (particle size 50 to 300 Angstroms : 5 to 30 nm), for example, by formation of a platinum sol in situ in the presence of powdered carbon which acts as a nucleating agent for the sol. The platinised carbon particles are then moulded onto an electrically conductive supporting structure, e.g. electrically conductive carbon paper, using a synthetic resin binder, preferably a fluorinated hydrocarbon resin, and especially polytetrafluoroethylene. Alternatively, platinum or palladium oxide having a similar particle size range may be used in place of the colloidal platinum, and adsorbed onto the carbon or graphite particles in a similar manner.

In an alternative, disclosed in US-A-4,293,396, the platinised carbon particles are impregnated into a preformed porous carbon cloth and bonded therein using the fluorocarbon resin, preferably polytetrafluoroethylene. It

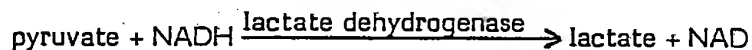
is to be understood, however, that the present invention is not limited to the use of Prototech materials, but embraces other similar substrate materials comprising a porous resin-bonded layer of platinised or palladised, or other noble metal containing activated carbon or graphite particles.

5 Whilst the preferred resin binders used to bind the platinised or palladised carbon or graphite particles are hydrophobic fluorocarbon resins, particularly polytetrafluoroethylene, other suitable natural or synthetic resin binders may be used, for example polyethylmethacrylate, polyvinyl acetate, polyvinyl chloride, polycarbonates, poly(4-methylpentene-1) poly-
10 isoprene, polychloroprene, poly(1,3-butadiene), silicone rubber and gelatin.

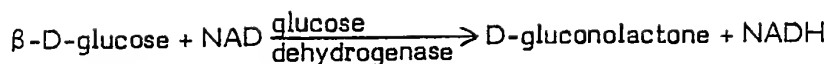
 The proportion of binder to the noble metal containing activated carbon or graphite particles, on a weight basis, may range from 10 to 75% binder and 90 to 25% activated carbon or graphite, preferably 20 to 50% binder and, correspondingly, 80 to 50% activated carbon or graphite. The
15 loading of noble metal, e.g. platinum or palladium or their corresponding oxides, or gold, on the activated carbon or graphite particles may range from 1 to 10% based on the total weight of activated carbon or graphite and binder, preferably from 2 to 8%, most preferably from 4 to 6%.

 Instead of moulding the resin/activated platinised or palladised
20 carbon powder directly onto the surface of a suitable support, e.g. directly onto the surface of electrically conductive carbon paper, the mixture of binder and platinised or palladised carbon powder may be suspended in a suitable inert medium, and applied to the surface of the substrate by a screen printing technique, thereby providing a thin film of resin-bonded
25 platinised or palladised carbon particles on the surface of the substrate.

 As well as the direct quantitative measurement of NADH in solution, the electrodes and process of the present invention may be used in the quantitative determination of NADH generated or consumed in situ for example by the enzymatic reaction between an enzyme and its cofactor.
30 Such reactions include for example the conversion of pyruvate to lactate by lactate dehydrogenase, i.e. the reaction



35 which reaction may be monitored by the decrease in NADH concentration; and the oxidation of glucose to gluconolactone by the reaction



which can be monitored by the increase in NADH concentration as the reaction proceeds. To this end the activated platinised or palladised carbon electrodes used in accordance with this invention may have an enzyme such as lactate dehydrogenase or glucose dehydrogenase incorporated into or immobilised onto the resin-bonded carbon layer by any of the enzyme immobilization techniques known in the art and taught for example in EP-A-0 247 850.

In a further modification of this concept the present invention also envisages a one off, disposable enzyme electrode and method in which the enzyme electrode itself comprises not only the immobilised enzyme, but also the appropriate cofactor for that enzyme, either NAD or NADH as the case may be, the enzyme electrode thus having the capability of responding amperometrically to the activity of the enzyme, as determined by the change in NADH concentration, when in contact with a sample, e.g. a clinical or biological sample, containing the relevant substrate for that enzyme, irrespective of whether that sample contains the necessary cofactor, since that is supplied by the electrode itself. The NAD or NADH cofactor may be incorporated into the electrode in any suitable manner such as impregnation with a suitable solution of either NAD or NADH and drying.

As is also well known in the art, the surface of the electrode material may or may not be protected by a porous membrane, such as a polycarbonate film having a pore size of for example about 0.03 μm . Other suitable membrane materials may also be used.

The invention is further described with reference to the accompanying drawings, in which:

Figure 1 is a diagrammatic section through a modified Rank Brothers electrochemical cell used to test the NADH response of the activated carbon electrodes in accordance with this invention;

Figure 2 shows the electrode response to successive additions of NADH to the cell using a platinised carbon paper (PCP) electrode according to this invention;

Figure 3 shows the response of the PCP electrode to NADH at various poisoning potentials versus the Ag/AgCl reference electrode;

Figure 4 shows the response of the electrode to pyruvic acid in the

presence of lactate dehydrogenase (LDH);

Figure 5 shows the response of the electrode to acetaldehyde in the presence of alcohol dehydrogenase (ADH);

Figure 6 is another graph showing the response of platinised carbon paper electrodes to NADH concentration in accordance with this invention;

Figure 7 shows the results of another experiment involving the response of the electrode to pyruvic acid;

Figure 8 shows the response of the electrode to NADH produced in situ by the enzymatic oxidation of glucose using glucose dehydrogenase

Figure 9 shows the similar response curve for a platinum oxide containing electrode; and

Figure 10 shows the response curve for a palladised activated carbon electrode.

In the following Examples, various platinised or palladised carbon paper (PCP) electrodes were tested for their response to NADH in a modified Rank oxygen electrode system (Rank Brothers, Bottisham, Cambridge) and as shown in the accompanying drawings (Figure 1). The modified Rank cell system comprises a two-part cell having a base (1) and an annular jacket (2) enclosing a water chamber (h), through which water may be circulated to control the temperature of the cell, the two parts being connected together by the captive threaded collar (3). Centrally located in the base (1) is a platinum contact button (d) onto which is placed the test disc (a) of paper electrode material and which is held in place on the platinum contact by rubber O-ring seals (e) and (f) when the two parts of the cell are coupled together.

Inserted into the top of the cell, which of course will contain the test NADH-containing solution, is a stopper (4) supported by an adjustable collar (g) and in which are mounted a platinum counter electrode (b) and an Ag/AgCl reference electrode (c). The tests were carried out with the working electrode poised at various potentials in the range 100 to 600 mV with reference to the Ag/AgCl electrode. Other tests were carried out in a two electrode cell as illustrated in Figure 16 of EP-A-0 247 850 and as described therein in detail. In the two electrode cell embodiment, the electrode material is held against a platinum contact button in the base of the cell by means of a polycarbonate (0.03 μm pore size) membrane and to which the NADH containing sample is applied. Surrounding the platinum

contact, in the base of the cell, but separated therefrom by an insulating sleeve is an annular Ag/AgCl reference electrode. The electrode cell is polarised at various potentials relative to the Ag/AgCl electrode and the output current monitored at various potentials.

5 The invention is illustrated by the following Examples in which the electrode material is a platinised carbon paper (PCP) as supplied by the Prototech Company of Newton Highlands, Massachusetts and developed by them as gas diffusion electrodes. The PCP electrode material is prepared according to the teachings of US-A-4,044,193 by initially platinising carbon
10 powder particles (Vulcan XC-72), nominal particle size 30 nm) by the oxidative decomposition of a complex platinum sulfite acid in the presence of the carbon powder using H_2O_2 , thereby to deposit colloidal platinum, particle size 1.5 to 2.5 nm, on the surface of the carbon powder particles. Following platinisation, the platinised carbon powder is subsequently moulded and
15 bonded onto the surface of a commercial, graphitised electrically conducting carbon paper using approximately 50% by weight, based on platinised carbon powder, of polytetrafluoroethylene as the binder. The resulting platinised carbon paper electrode material has a thickness in the range 0.1 to 0.5 mm, and a platinum loading of 0.24 mg.cm^{-2} . For the purpose of the
20 following tests (Examples 1 to 3), the carbon paper electrode material was cut into 5 mm diameter discs and mounted on the platinised working electrode of the cell system shown in Figure 1 of the accompanying drawings. The actual area of the carbon paper electrode exposed to the sample in each case is approximately 0.16 cm^2 .

25 The results obtained are as follows:

EXAMPLE 1

Electrochemical oxidation of NADH on platinised carbon paper (PCP)

30 Using a standard potentiostatic technique, samples of a 20 mM NADH solution in Tris/HCl pH 9 buffer were added to the cell containing 2 ml of 0.1 M pH 7 phosphate/1 M KCl buffer solution. The platinised carbon paper electrode (PCP) was poised at various potentials with respect to the Ag/AgCl reference electrode. The counter electrode was platinum. Stable current plateaus were obtained (Figure 2) which were proportional to NADH
35 concentration (Table 1 and Figure 3).

Table 1
Current response of platinised carbon paper
to NADH at various poisoning potentials

5	<u>NADH Concentration/mM</u>	<u>Current Output in μA at</u>		
		<u>100 mV</u>	<u>300 mV</u>	<u>600 mV</u>
	0.95	7	15	28
	1.8	13	25	53
	2.7	-	32	73
10	4.0	38	42	113
	6.6	-	52	183
	10.0	60	-	-

EXAMPLE 2

15 Response of NADH-electrode system to pyruvic acid in the presence of lactate dehydrogenase (LDH)

A similar cell was set up containing 12.5 mM NADH and 10 mM pyruvic acid in 2 ml of pH 7 phosphate/KCl buffer at 25°C. The working, counter and reference electrodes were as in Example 1. The working electrode was poised at 400 mV and gave a steady signal of 170 μ A above background. On addition of 120 units of LDH (bovine heart Type XV) the current decreased at an initial rate of 92 μ A/min (Figure 4) showing that the enzymatic conversion of pyruvate to lactate is efficiently monitored via the agency of NADH electrochemically coupled to the electrode.

EXAMPLE 3

25 Response of NADH-electrode system to acetaldehyde in the presence of alcohol dehydrogenase (ADH) on a PCP electrode

The cell was set up containing 3 mM NADH and 35 mM acetaldehyde in 2 ml of pH 9 Tris/HCl buffer at 25°C. The working, counter and reference electrodes were as in Example 1. The working electrode was poised at 400 mV and gave a steady signal of 40 μ A above background. On addition of 2 units of ADH (equine liver) the current decreased at an initial rate of 130 μ A/min (Figure 5) showing that the enzymatic conversion of acetaldehyde to ethanol is efficiently monitored via the agency of NADH electrochemically coupled to the electrode.

In the following examples either a two electrode cell or a three electrode cell configuration was employed. The three electrode cell was as herein described and illustrated in Figure 1. The two electrode cell was identical in construction to that shown in Figure 16 of EP-A-0 247 850 to which reference should be made for further details.

EXAMPLE 4 (Figure 6)

The data was compiled using the two electrode configuration polarised at 200 mV. A buffer of 16 mmol/L NaH_2PO_4 , 53 mmol/L Na_2HPO_4 , 52 mmol/L NaCl, 1.5 mmol/L ethylenediamine tetraacetic acid, pH 7.4, was used. After achieving a stable background current in this buffer, the buffer was wiped off the membrane and replaced with samples of NADH in the same buffer. The peak current was recorded. Figure 6 shows the responses from a platinised carbon paper electrode as commercially available from the Prototech Company and comprising resin-bonded platinised carbon particles deposited on an electrically conductive carbon paper backing sheet, the resin-bonded platinised carbon layer comprising, on a weight basis, 50% polytetrafluoroethylene, 45% finely divided carbon (Vulcan XC72) and 5% colloidal platinum preadsorbed onto the carbon powder. To minimise the background current a 5 mg/ml protein solution (glucose oxidase) was adsorbed onto the electrode overnight prior to NADH measurements. It should be noted that the glucose oxidase is merely an example of a suitable protein.

EXAMPLE 5 (Figure 7)

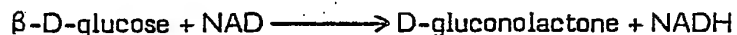
This illustrates the applicability of the invention to measurement of the substrates of NADH-utilizing enzymes. A three electrode cell was used as previously described but equipped with a magnetic stirrer bar. The working electrode was platinised carbon paper as in Example 4, but L-lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27 from beef heart) was immobilised to the electrode via carbodiimide coupling, see EP-A-0 247 850, but using a 1 mg/ml solution of lactate dehydrogenase (from Sigma Chemicals, type XV, 500 units per mg protein). The cell contained 12.5 mmol/L NADH initially, in 0.1 mol/L phosphate/1 mol/L KCl buffer, pH 7. The polarising potential was 350 mV. The apparatus could be used to monitor the consumption of NADH when aliquots pyruvic acid were added to the cell, as shown in the Figure.

EXAMPLE 6 (Figure 8)

Example 5 was repeated except that the immobilised lactate dehydrogenase was replaced by glucose dehydrogenase (EC 1.1.1.47 from *Bacillus* spp, supplied by Sigma, 100-300 U/mg protein) immobilised onto the electrode in a similar manner. Whereas lactate dehydrogenase is used to measure pyruvic by monitoring NADH consumption



the glucose dehydrogenase is used to measure glucose by following NADH production:



The cell contained 0.1 mol/L phosphate/0.1 mol/L KCl/2.4 mmol/L NAD, pH 7.

EXAMPLE 7 (Figure 9)

Following the procedure outlined in Example 4, the current output of a platinum oxide containing carbon electrode is measured at 200 mV (against a Ag/AgCl reference electrode) in a two electrode cell at various NADH concentrations, and shows a substantially linear response equivalent to that of the platinised carbon paper electrodes. In this case the electrode material comprises a layer of resin-bonded (polytetrafluoroethylene) carbon particles (Vulcan XC72) having 5% by weight (based on total weight of the resin-bonded particles) platinum oxide preadsorbed onto the carbon powder particles; binder 50% by weight, carbon 45% by weight, and bonded to the surface of electrically conductive Toray (trade mark) carbon paper.

EXAMPLE 8 (Figure 10)

Once again, following the procedure outlined in Example 4, the current output of a palladised carbon paper electrode is measured at 200 mV (against Ag/AgCl) using the two electrode cell configuration at various NADH concentrations. Once again the response (Figure 10) is substantially linear. The electrode material is as described in Example 7 save that the resin-bonded carbon particles comprise 5% by weight preadsorbed finely

divided palladium.

The above Examples demonstrate the use of the electrode materials to produce a rapid and reproducible oxidation of NADH. These responses are in marked contrast to those given by most other electrode materials, as demonstrated in comparable experiments using platinum, glassy carbon, or graphite electrode materials, which (with rare exceptions) are generally sluggish, relatively insensitive, and of much poorer reproducibility. The effectiveness of the platinised or palladised carbon electrodes we have used appears to be a result of their particular heterogeneous structure and its compatibility with biological molecules such as NADH and enzymes. The oxidation of NADH also proceeds efficiently in the presence of enzymes and substrates, and can be used as a basis for rapid NADH-coupled enzymatic assays. The potential for efficient assay of pyruvate (using LDH) and acetaldehyde (using ADH) is clear from the above Examples, but a very large number of similar assays are also accessible using other enzymes and substrates.

Although the invention has been described herein solely with reference to the determination of NADH in solution, phosphorylated 1,4-dihydronicotinamide adenine dinucleotide (NADPH), i.e. phosphorylated NADH, may be determined by exactly the same technique. Moreover, since NADPH (or NADP) is a cofactor in a selected group of enzyme catalysed reactions, rather than NADH (or NAD), the technique of this invention enables such reactions to be monitored in exactly the same way, i.e. by amperometrically determining either the consumption or the production of NADPH in solution. Thus all references herein to NADH, or NAD, are to be taken to include the phosphorylated derivative unless the context requires otherwise.

CLAIMS

1. A method for the quantitative determination of 1,4-dihydronicotin-
amide adenine dinucleotide (NADH) in solution which comprises contacting
5 the NADH-containing solution with an activated carbon electrode, maintain-
ing the carbon electrode at a controlled, fixed potential effective to cause
oxidation of NADH at the electrode surface, and measuring the current
output from the carbon electrode, wherein there is used a noble metal
containing activated carbon electrode comprising a porous, heterogeneous,
10 resin-bonded layer of activated carbon or graphite particles having finely
divided noble metal or the corresponding oxides preadsorbed onto the
activated carbon or graphite particles, and bonded together with a natural
or synthetic resin binder.
- 15 2. A method according to claim 1, wherein said resin binder is a fluoro-
carbon resin.
3. A method according to claim 2, wherein said fluorocarbon resin is
polytetrafluoroethylene.
- 20 4. A method according to any one of claims 1 to 3, wherein the resin-
bonded noble metal containing carbon or graphite particles are formed as a
resin-bonded surface layer on an underlying support member.
- 25 5. A method according to claim 4, wherein the underlying support
member is electrically conductive.
6. A method according to claim 5, wherein said electrically conductive
support member is a layer of electrically conductive carbon paper to which
30 said noble metal containing carbon or graphite particles are bonded as a
surface layer.
7. A method according to any one of claims 1 to 3, wherein the resin-
bonded noble metal containing carbon or graphite particles are impregnated
35 into and supported by a carbon fibre web.

8. A method according to any one of claims 1 to 7, wherein said noble metal containing carbon or graphite particles have a particle size in the range 5 to 30 nm.
9. A method according to any one of claims 1 to 8, wherein said carbon or graphite particles are pre-platinised or pre-palladised particles having finely divided platinum or palladium, or the corresponding oxides, preadsorbed onto the graphite or carbon particles.
10. A method according to claim 8, wherein there is used a platinised or palladised carbon electrode comprising as said pre-platinised or pre-palladised carbon or graphite particles, carbon or graphite particles having particles of colloidal platinum or palladium metal pre-adsorbed onto the surface thereof, said colloidal platinum or palladium particles having a particle size in the range 1.5 to 2.5 nm.
11. A method according to any one of claims 1 to 8, as applied to monitoring the production or consumption of NADH in an enzymatic reaction between an enzyme and its substrate and involving either NADH or NAD as a cofactor.
12. A method according to claim 11, wherein there is used a noble metal containing carbon electrode having said enzyme incorporated or immobilised thereon or therein, and in which the electrode is used to monitor the activity of the enzyme via the change of NADH concentration when the electrode is in contact with a sample containing the enzyme substrate and in the presence of either NAD or NADH as a cofactor involved in the reaction between the enzyme and its substrate.
13. A method according to claim 12, wherein there is used a noble metal containing electrode having said enzyme incorporated or immobilised thereon or therein in conjunction with the NADH or NAD cofactor, as appropriate, the NADH or NAD cofactor thus being introduced into the sample via the electrode.
14. A one off, disposable enzyme electrode for use in the method of

claim 13, comprising an activated carbon electrode consisting of or comprising a porous, resin-bonded heterogeneous layer of activated carbon or graphite particles having a finely divided noble metal, or the corresponding oxide, preadsorbed onto the activated carbon or graphite particles, and
5 bonded together with a synthetic hydrophobic resin binder, said resin-bonded layer having an enzyme immobilised therein or thereon in conjunction with NAD or NADH as a cofactor for said enzyme, said electrode responding amperometrically to the activity of said enzyme, when in the presence of its substrate, and said NAD or NADH as the case may be.

10

15. A one off, disposable enzyme electrode according to claim 14, wherein said activated carbon electrode comprises a porous, resin-bonded heterogeneous surface layer of pre-platinised or pre-palladised activated carbon or graphite particles bonded with a fluorocarbon resin, and supported
15 on an underlying support member, and having said enzyme and said cofactor immobilised therein or thereon.

20

16. A one off disposable enzyme electrode according to claim 15, wherein the underlying support member for said resin-bonded layer of pre-platinised or pre-palladised activated carbon or graphite particles comprises an electrically conductive carbon paper.

1/7

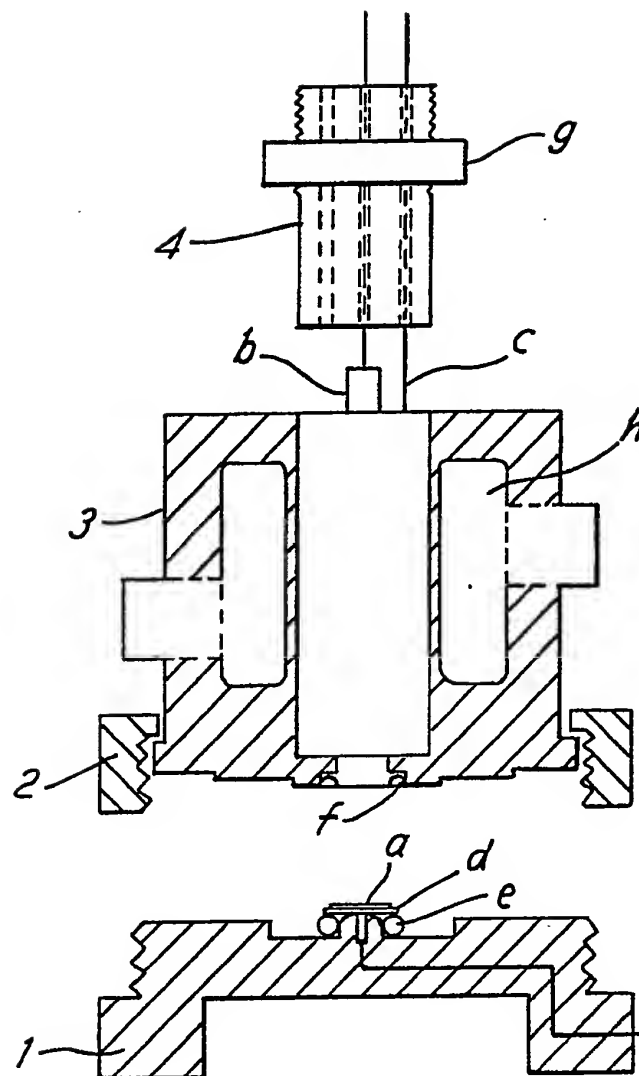


FIG.1

2/7

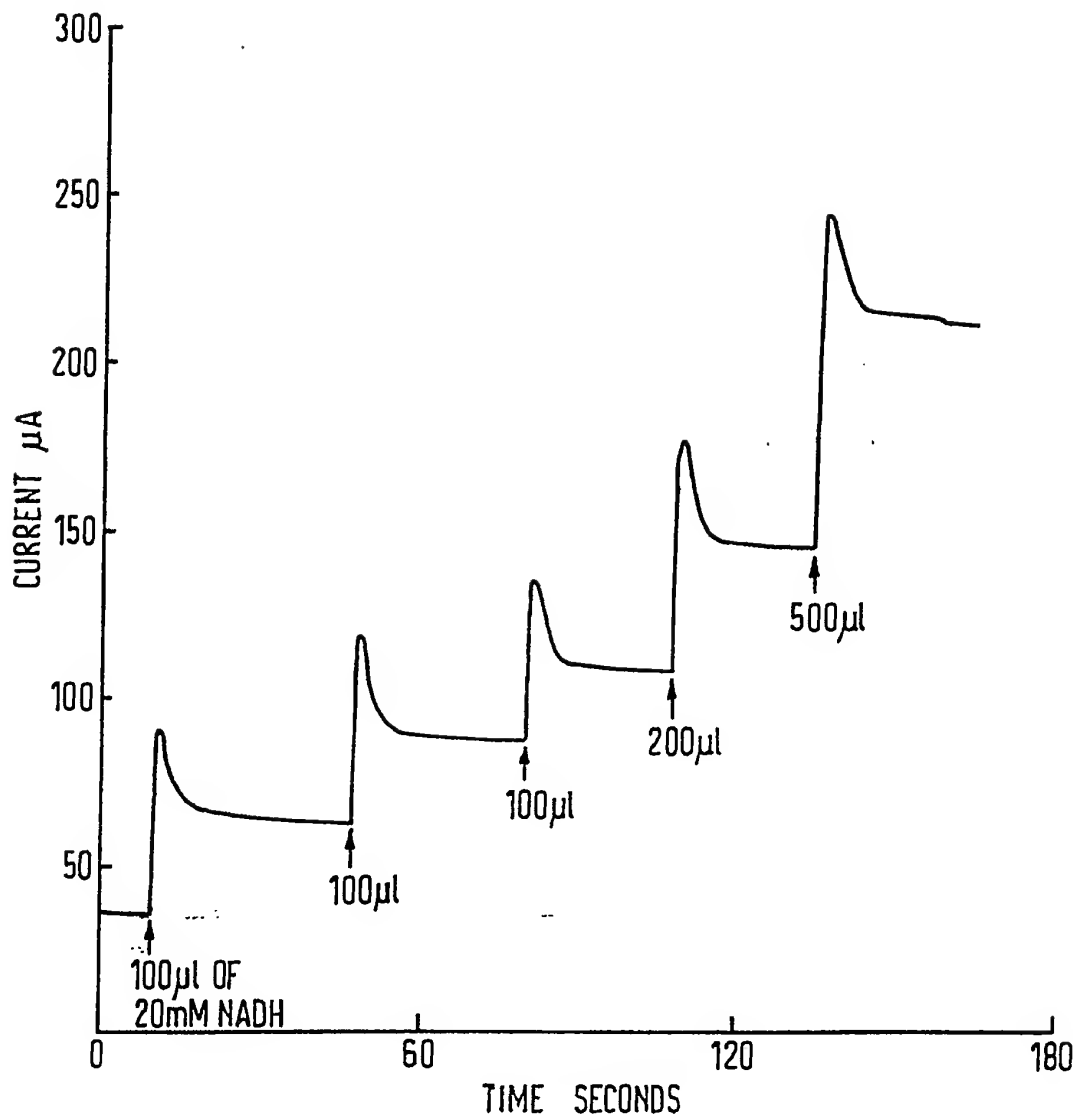


FIG.2

3/7

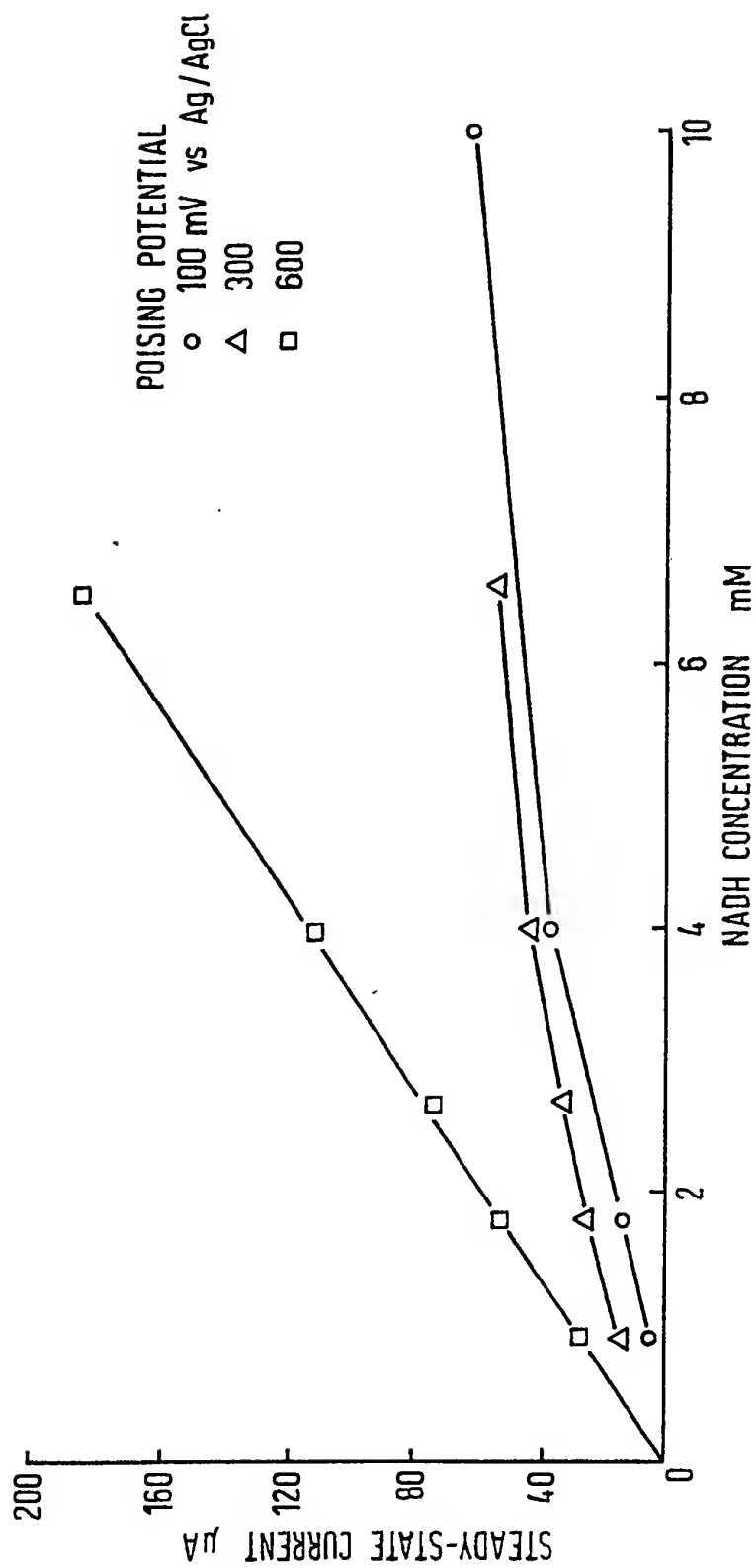
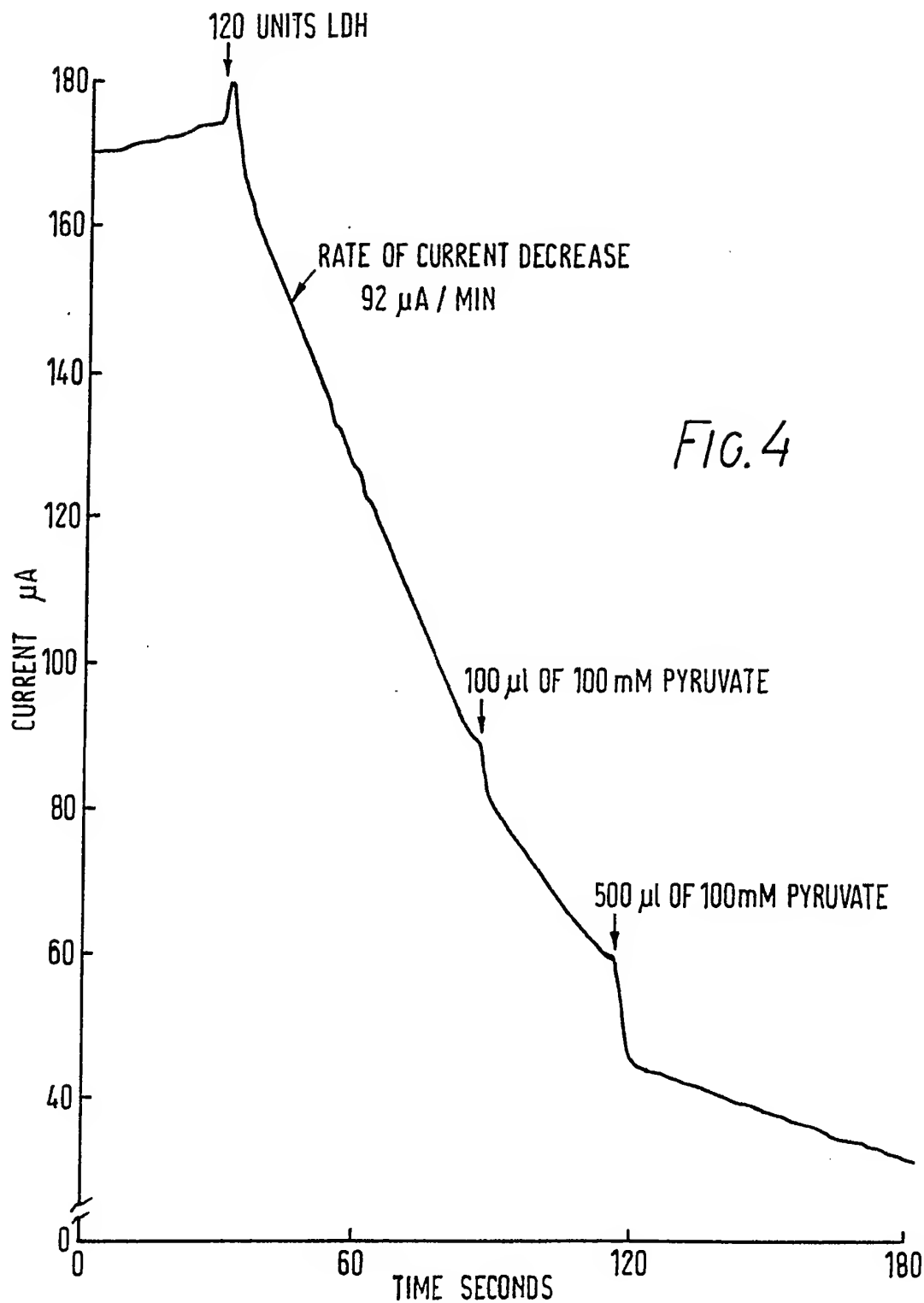
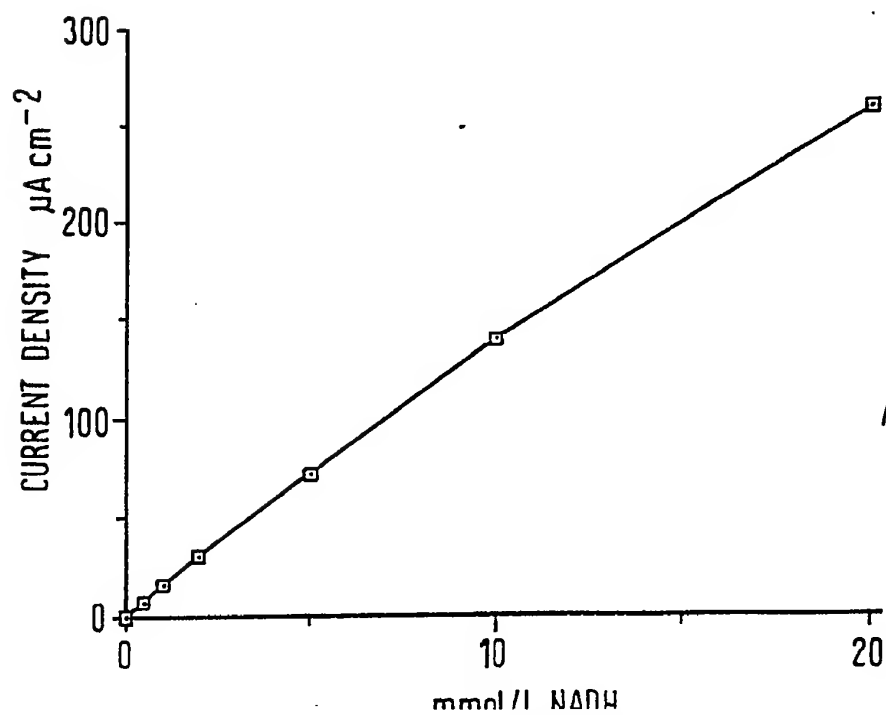
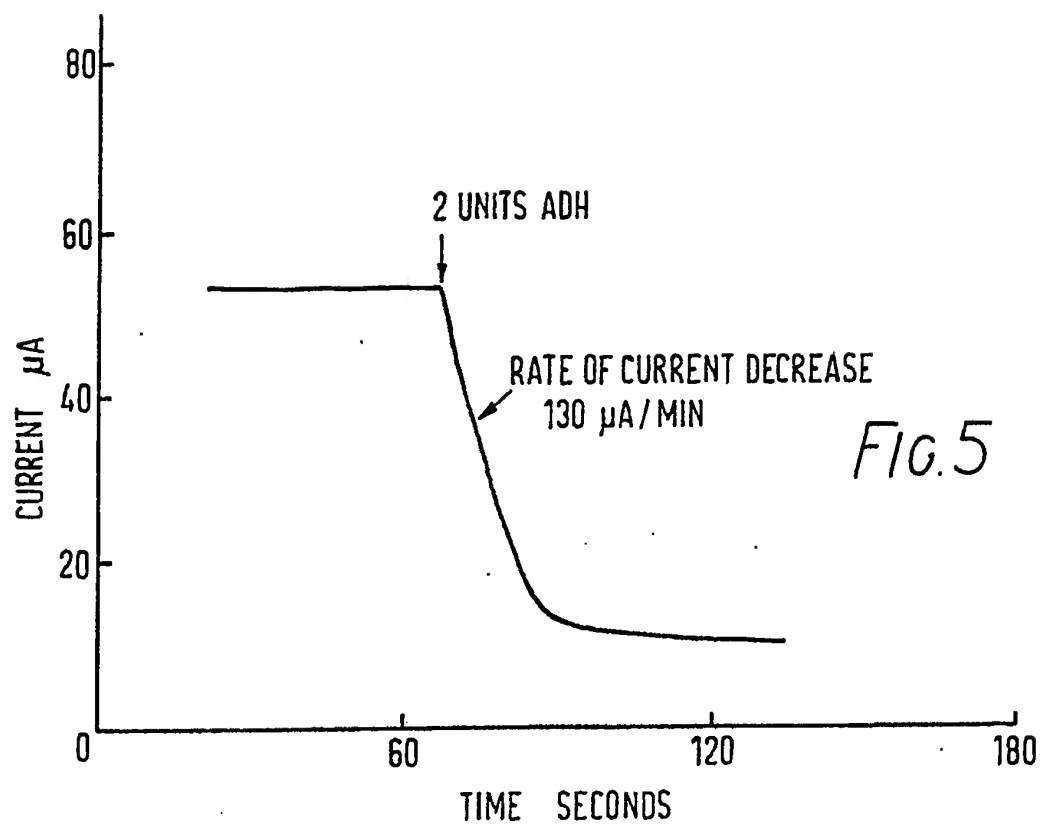


FIG. 3

4/7



5/7



6/7

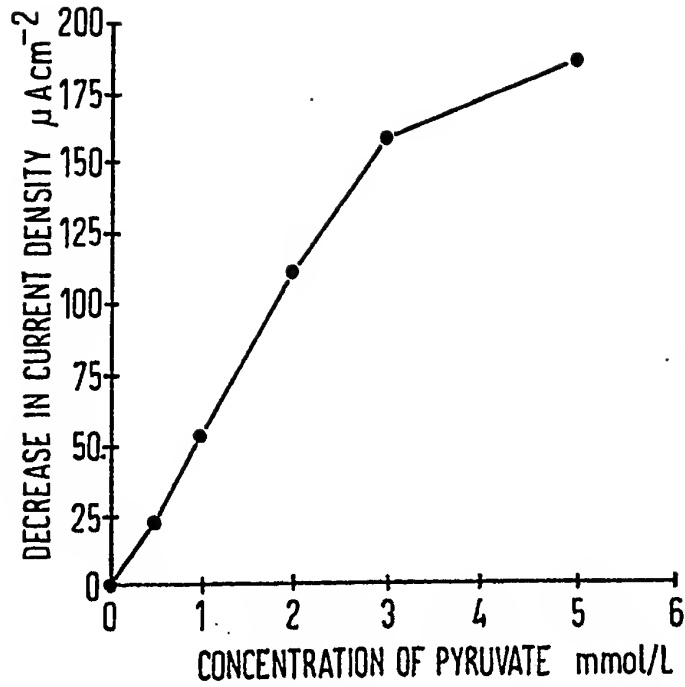


FIG. 7

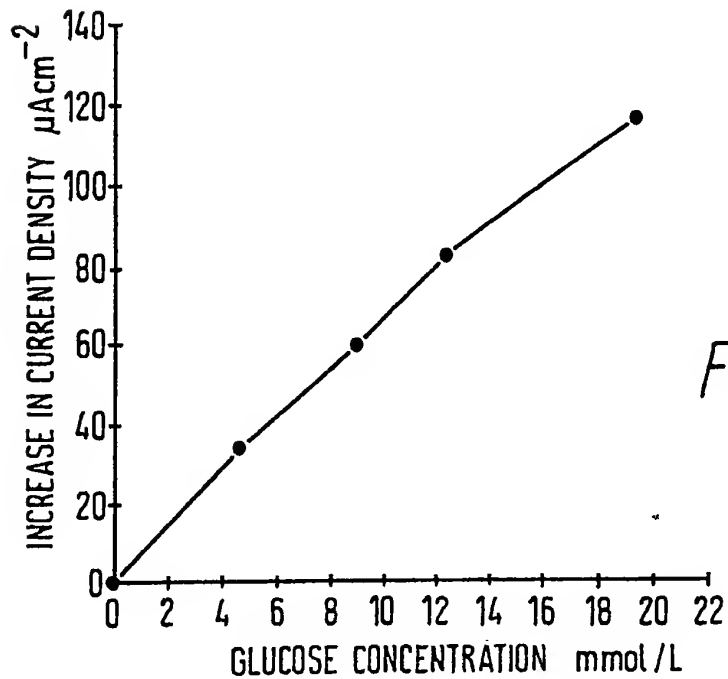


FIG. 8

7/7

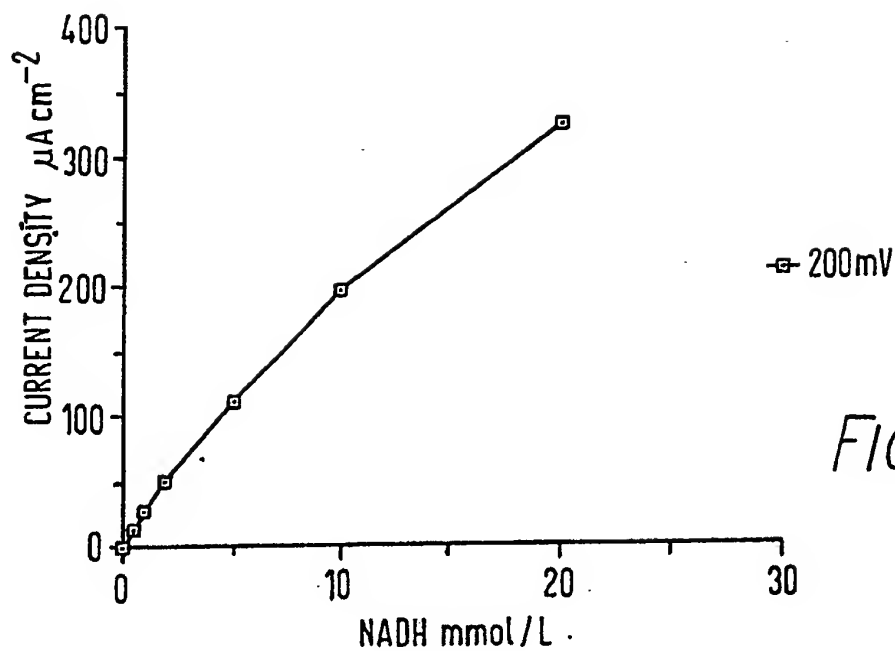


Fig. 9

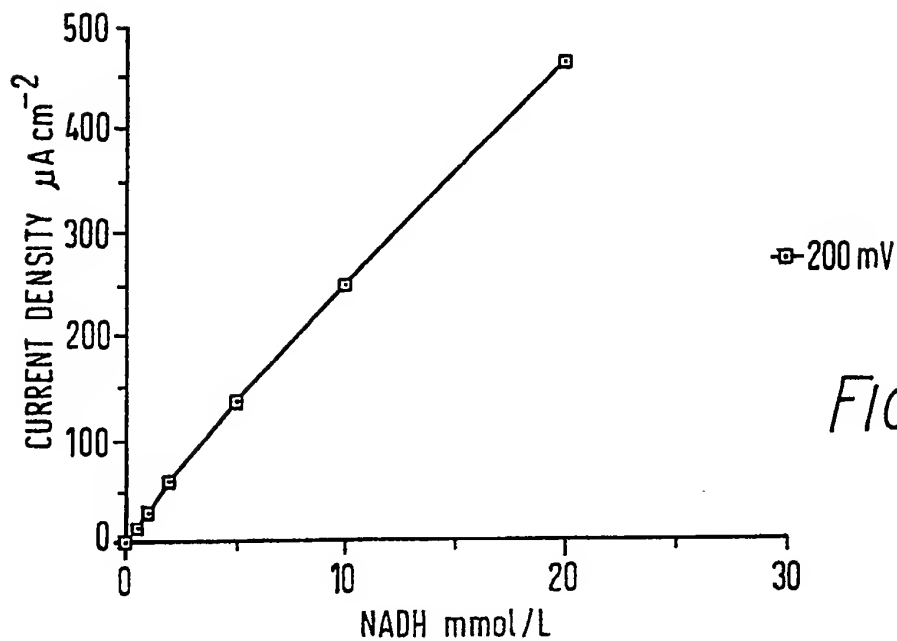


Fig. 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/GB 88/00338

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ⁶		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
IPC ⁴ : C 12 M 1/40; G 01 N 33/48		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
IPC ⁴	C 12 M; G 01 N	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
P, A	EP, A, 0247850 (CAMBRIDGE LIFE SCIENCES) 2 December 1987, see abstract; page 4, lines 18-41; claims cited in the application --	1-16
A	US, A, 4166143 (PETROW et al.) 28 August 1979, see abstract; claim 1 cited in the application -----	1-10, 14-16
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>[*] Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"G" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
5th July 1988	25 JUL. 1988	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
EUROPEAN PATENT OFFICE	M. VAN MOL	

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

GB 8800338

SA 22049

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 15/07/88
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0247850	02-12-87	WO-A- 8707295 GB-A- 2191003 AU-A- 7436987	03-12-87 02-12-87 22-12-87
US-A- 4166143	28-08-79	None	